

基于代谢组学的水杨酸钠对HEI-OC1细胞损伤作用机制

何明哲¹, 彭英¹, 王广基¹, 阿基业¹, 郑亦文², 孙建国^{1*}

(¹中国药科大学药物代谢动力学重点实验室,南京 210009; ²新西兰奥塔哥大学生物医学学院药理毒理学系,达尼丁 9054)

摘要 基于LC-Q-TOF/MS技术探究水杨酸钠对小鼠HEI-OC1毛细胞样细胞中内源性代谢的影响。首先采用不同浓度的水杨酸钠处理HEI-OC1细胞,使用CCK-8法检测细胞存活率的变化。然后观察不同干预时间下水杨酸钠对细胞形态的影响,并利用代谢组学技术进行研究,筛选组间差异代谢产物,分析相关的代谢通路。结果表明,水杨酸钠能够显著抑制HEI-OC1细胞的存活率,且随着浓度的增加,抑制作用增强。同时水杨酸钠能够使细胞形态拉长,并在停止给药后恢复正常。水杨酸钠处理HEI-OC1细胞后共筛选出乳清酸、尿苷、天冬氨酸等18种差异代谢物,主要涉及丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢及嘧啶代谢这两条可能的代谢通路。综上所述,本研究通过代谢组学技术评价了水杨酸钠对HEI-OC1细胞的作用,可为水杨酸钠耳毒性及耳鸣的发生发展研究提供新思路。

关键词 水杨酸钠;代谢组学;HEI-OC1细胞;生物标志物

中图分类号 R969.1 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2021)05-0566-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20210508

引用本文 何明哲,彭英,王广基,等.基于代谢组学的水杨酸钠对HEI-OC1细胞损伤作用机制[J].中国药科大学学报,2021,52(5):566-572.

Cite this article as: HE Mingzhe, PENG Ying, WANG Guangji, et al. Mechanism of sodium salicylate-induced damage to HEI-OC1 cells based on metabolomics[J]. J China Pharm Univ, 2021, 52(5): 566–572.

Mechanism of sodium salicylate-induced damage to HEI-OC1 cells based on metabolomics

HE Mingzhe¹, PENG Ying¹, WANG Guangji¹, A Jiye¹, ZHENG Yiwen², SUN Jianguo^{1*}

¹Key Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;

²Department of Pharmacology and Toxicology, School of Biomedical Sciences, University of Otago, Dunedin 9054, New Zealand

Abstract The effect of sodium salicylate on the endogenous metabolism of hair cell-like cells (HEI-OC1) of mice was analyzed based on liquid chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometry (LC-Q-TOF/MS). Firstly, HEI-OC1 cells were treated with different concentrations of sodium salicylate, and cell survival was examined by the CCK-8 method. Next, sodium salicylate was administered for different duration to observe the changes in cell morphology. Inter-group differential metabolites were screened out, and the associated metabolic pathways were analyzed based on metabolomic technology. Results showed that sodium salicylate could significantly inhibit the survival rate of HEI-OC1 cells, and that, as the concentration increased, the inhibitory effect became stronger. Also, the cell morphology could be elongated after administration and return to normal after withdrawal. Eighteen differential metabolites such as orotic acid, uridine and aspartic acid were screened out after treatment of sodium salicylate, which mainly involving two possible metabolic pathways, namely the metabolism of alanine, aspartic acid and glutamic acid, and that of pyrimidine. In summary, the application of metabolomics technology to evaluate the effect of sodium salicylate on hair cells from the microscopic perspective can provide new ideas for the study of sodium salicylate ototoxicity and development of tinnitus.

Key words sodium salicylate; metabolomics; HEI-OC1 cell; biomarkers

This study was supported by the National Key Research and Development Program for Intergovernmental Cooperation in International Science and Technology Innovation (No. 2017YFE0109600)

耳鸣是常见的听觉系统疾病。据估计,全世界 10% 以上的人口在其一生中都有过耳鸣^[1-2]。长期的耳鸣症状严重影响了患者的生活质量及身心健康,且已成为影响社会经济发展的全球性健康问题。然而,耳鸣发生的病理机制和靶点不清,缺乏可靠的动物模型,新药研发困难,临幊上缺乏有效治疗药物,亟需进行耳鸣疾病的基础研究以及治疗药物的开发。

水杨酸钠通常用于构建耳鸣动物模型^[3]。与其他耳毒性药物如氨基糖苷类、抗肿瘤药物和袢利尿剂等不同,水杨酸盐所导致的耳鸣及听力下降一般在停药 24~72 h 后消失,呈现可逆的耳毒性特征。水杨酸钠的耳毒性作用目前研究较多,但其明确机制目前尚不完全清楚。耳蜗毛细胞是水杨酸钠耳毒性作用的主要靶细胞之一,其功能的改变在水杨酸钠耳毒性机制中起关键作用^[4]。

代谢组学(metabolomics)是一门新兴的系统生物学研究方法,目前广泛应用于研究生物体内源性小分子代谢物的含量变化,同时对相关的代谢通路进行分析,对探究代谢物与生理病理变化之间的相互关系以及药物治疗机制具有一定的指导意义^[5]。然而生物体样本如血清、组织等的代谢产物容易受到各种外界因素的干扰。细胞是生物体结构和功能的基本单位,受外界影响较少,其代谢组学研究广泛运用于疾病机制探究、药理学等研究^[6]。但目前尚未有文献报道水杨酸钠对毛细胞内源性调控的影响,其涉及的相关通路尚不清楚。本研究使用小鼠 HEI-OC1 细胞作为体外实验的对象,拟通过代谢组学的方法研究水杨酸钠干预 HEI-OC1 细胞后小分子代谢物的变化,以探索水杨酸钠对 HEI-OC1 细胞毒性作用的内源性代谢调控机制,为耳鸣作用机制的研究及治疗药物的开发提供参考。

1 材 料

1.1 药品与试剂

水杨酸钠(纯度大于 99.5%,批号:C2013137,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);注射用青霉素钠(山东鲁抗医药股份有限公司);DMEM 培养

基(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);胎牛血清(美国 Hyclone 公司);胰蛋白酶(美国 Amersco 公司);细胞培养耗材(美国 Costar 公司);CCK-8 试剂盒、BCA 蛋白检测试剂盒(江苏碧云天生物技术研究所);其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪 器

Triple TOF 5600(美国 Sciex 公司)配有岛津高效液相仪(日本 Shimadzu 公司);SynergyH1 全功能微孔板检测仪、Lionheart 智能活细胞成像分析仪(美国 Bio-Tek 公司);真空旋转挥干仪、IEC 低温高速离心机(美国 Thermo 公司)。

1.3 细 胞

小鼠耳蜗类毛细胞系 HEI-OC1 (house ear institute-organ of corti 1)由东南大学生命科学研究院柴人杰教授惠赠。细胞培养于含 10% 胎牛血清(FBS)和 100 IU/mL 青霉素的高糖 DMEM 培养基中,于 37 °C、含 5% CO₂、相对湿度 90% 的培养箱中常规培养,隔天换液,当细胞汇合度达到 90% 后进行传代,取 5~15 代的细胞用于实验。

2 方 法

2.1 细胞毒性指标测定

目前,与耳鸣相关的耳毒性指标较少,通常为行为学相关的主观性指标。本研究以 HEI-OC1 细胞为研究对象,因缺乏明确的耳毒性相关指标,所以从细胞增殖活性及细胞形态的角度考察了水杨酸钠对 HEI-OC1 细胞的毒性作用。

2.1.1 细胞增殖活性测定 采用 CCK-8 法对 HEI-OC1 细胞的增殖活性进行检测,以每毫升 9×10⁴ 个细胞的密度接种于 96 孔板中,每孔为 100 μL,培养 24 h 后弃去培养基,分别加入含不同浓度水杨酸钠(1, 2, 5, 10, 20, 30 mmol/L)的无血清培养基培养 24 h。弃去培养基,每孔中分别加入 10% CCK-8 试剂,轻轻摇匀,37 °C,避光孵育 1 h。将 96 孔板置于酶标仪中,在 450 nm 检测每孔的吸收度。

2.1.2 细胞形态观察 以每毫升 9×10⁴ 个细胞的密度将 HEI-OC1 细胞接种于 6 孔板中,每孔为 2 mL,在培养 24 h 后弃去培养基。根据 CCK-8 的结果,

选择合适的水杨酸钠浓度干预细胞,分别在孵育0,12,24 h以及停止给药后12,24 h在活细胞成像仪下观察细胞形态。

2.2 代谢组学处理

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Waters XBridge Amide (4.6 mm × 100 mm, 3.5 μm);柱温:40 °C;水相(A):5 mmol/L醋酸铵的超纯水,用氨水调节pH至9.0(含5%乙腈);有机相(B):乙腈;流速:0.4 mL/min;分析时间:26.0 min;梯度洗脱:0~3.0 min(85% B)、3.0~6.0 min(85%~30% B)、6.0~15.0 min(30%~2% B)、15.0~18.0 min(2% B)、18.0~19.0 min(2%~85% B)、19.0~26.0 min(85% B)。

2.2.2 质谱条件 选用电喷雾离子源(ESI)负离子模式进行检测,母离子扫描范围: m/z 50~1 000,子离子扫描范围: m/z 50~900,离子喷雾电压设定为-4.5 kV,喷雾温度设定为550 °C,辅助气1、辅助气2和气帘气均为氮气,分别设定为50,30,30 psi(1 psi = 6.895 Pa)。TOF-MS扫描时去簇电压(DP)和碰撞能量(CE)分别设为-100 V和-10 V。进行MS/MS碎裂时,去簇电压和碰撞能量分别设为-100 V和-35 V。

2.2.3 细胞样本制备 实验分为空白对照组、给药12 h组、给药24 h组、停止给药12 h组以及停止给药24 h。收集生长状态良好的HEI-OC1细胞,以每毫升 9×10^4 个细胞的密度接种于6孔板中,每孔2 mL,待细胞汇合度达到90%左右后开始给药。根据CCK-8的结果,选择合适的水杨酸钠浓度干预细胞。给药时弃去含血清培养基,贴壁加入含水杨酸钠的DMEM无血清培养基2 mL,分别于给药后0,12,24 h以及给药24 h停止给药后的12,24 h收集细胞,进行后续代谢组学分析。

2.2.4 细胞样本处理 使用PBS清洗6孔板3次,加入超纯水320 μL,在-80 °C反复冻融3次,刮下细胞,转移至1.5 mL EP管中。每个样品各取细胞悬液20 μL进行蛋白定量,剩余的300 μL细胞悬液加入含有15 μg/mL ^{13}C -谷氨酰胺内标的甲醇溶液450 μL,充分振荡5 min,4 °C 18 000 r/min离心10 min,离心后转移上清液600 μL至新EP管中。剩余沉淀再次加入含内标的甲醇溶液450 μL,充分振荡,4 °C下18 000 r/min离心10 min,离心后转移上清液200 μL至EP管中合并,真空浓缩不加热

挥干,加入超纯水100 μL复溶,4 °C 18 000 r/min离心10 min,取上清液75 μL于进样瓶,20 μL进样。

2.2.5 LC-Q-TOF/MS分析与数据采集 如上所述进行ESI源条件设定。每8个样品进行1次自动校准,此外将所有细胞样品混合作为质控(quality control, QC)样本,每6个样品插入1个QC样品以监测分析的稳定性。利用在线工作站进行数据采集。

2.2.6 化合物鉴定和数据处理 本实验室通过标准品的保留时间以及质荷比建立了基于LC-Q-TOF/MS的化合物鉴定库,通过MultiQuant分析软件(Ver 2.0,美国AB SCIEX公司)用于化合物鉴定及积分^[7-8]。将LC-Q-TOF/MS所得到的原始图谱导入至MultiQuant分析软件进行峰提取和峰匹配。所得到数据进一步进行背景扣除、缺失值填补、总面积归一化等预处理后,导入到SIMCA-P(Ver 13.0,瑞典Umetrics公司)软件进行数据分析,主要包括主成分分析(principal component analysis, PCA)、偏最小二乘法分析(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)、正交偏最小二乘法分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA),然后通过VIP(变量投射重要性)>1和 $P < 0.05$ 的条件筛选出符合条件的差异化合物,使用京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)和人类代谢组数据库(Human Metabolome Database, HMDB)等数据库进行比对,进一步聚焦差异化合物。将找出的差异化合物导入至MetaboAnalyst在线网站进行了通路分析,找到与水杨酸钠所造成的HEI-OC1细胞毒性相关的代谢通路。

3 结 果

3.1 水杨酸钠降低HEI-OC1细胞的增殖活力

为了考察水杨酸钠对HEI-OC1细胞的毒性作用,并为后续代谢组给药浓度提供参考,测定了不同浓度的水杨酸钠给药后细胞的活力。结果(图1)表明:1,2和5 mmol/L水杨酸钠作用24 h,对细胞存活基本无影响;大于10 mmol/L水杨酸钠表现出明显的细胞毒性,且HEI-OC1细胞的活力随水杨酸钠作用浓度的增加而降低,表明水杨酸钠对HEI-OC1细胞的毒性作用具有明显的浓度相关性。由于20 mmol/L水杨酸钠处理细胞后其存活

率为 50% 左右, 接近于水杨酸钠对 HEI-OC1 细胞的 IC_{50} , 后续采用此浓度进行实验。

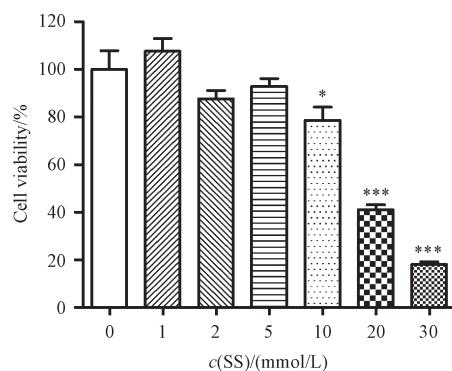


Figure 1 Survival rate of HEI-OC1 cells treated with different concentrations of sodium salicylate (SS) for 24 hours ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs 0 mmol/L sodium salicylate group

3.2 水杨酸钠对 HEI-OC1 细胞形态产生影响

由图 2 可知, 20 mmol/L 水杨酸钠给药 24 h 后 HEI-OC1 细胞形态发生改变, 细胞与未给药组相比明显拉长; 在停止给药恢复 24 h 后, 细胞形态趋于正常。结果提示, 水杨酸钠对 HEI-OC1 细胞的毒性作用具有可逆性。

3.3 水杨酸钠对 HEI-OC1 细胞内源性代谢的影响

3.3.1 方法稳定性评价 通过质控样本测试 LC-Q-TOF/MS 的稳定性, 分别提取 QC 样品中 10 个离子检测。结果表明, 10 个离子相对保留时间的 RSD 范围是 0.06% ~ 2.50%, 而相对峰面积的 RSD 范围是 2.15% ~ 14.02% (表 1)。根据图 3-A, 对各组样本数据进行 PCA 分析, 发现 QC 样本聚集度高, 说明实验建立的方法重复性和稳定性较好。

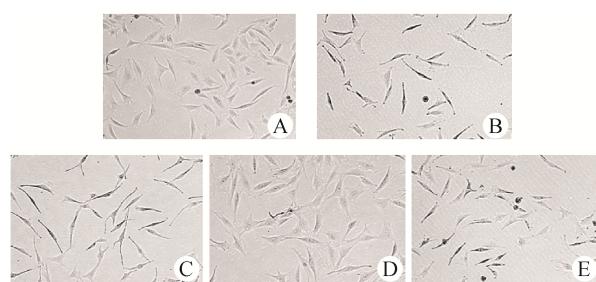


Figure 2 Morphological changes of HEI-OC1 cells treated with 20 mmol/L sodium salicylate for different time

A: Control; B: Administration for 12 h; C: Administration for 24 h; D: Withdrawal for 12 h; E: Withdrawal for 24 h

Table 1 RSD results of t_R and relative areas of 10 ions in quality control (QC) samples

| No. | t_R /min | RSD/% of t_R | RSD/% of relative areas | Ion |
|-----|------------|----------------|-------------------------|-----|
| 1 | 2.66 | 0.19 | 12.99 | M-H |
| 2 | 3.37 | 0.15 | 7.19 | M-H |
| 3 | 6.86 | 2.50 | 10.93 | M-H |
| 4 | 7.09 | 1.41 | 14.02 | M-H |
| 5 | 8.45 | 0.09 | 6.29 | M-H |
| 6 | 9.25 | 2.12 | 10.43 | M-H |
| 7 | 9.25 | 0.06 | 2.15 | M-H |
| 8 | 12.53 | 0.17 | 8.75 | M-H |
| 9 | 14.12 | 0.17 | 3.88 | M-H |
| 10 | 25.74 | 1.28 | 9.81 | M-H |

3.3.2 多元统计分析 通过代谢组学研究 20 mmol/L 水杨酸钠在不同干预时间下对 HEI-OC1 细胞的影响。对各组样本采用有监督的 PLS-DA 分析, 可以看出 PLS-DA(图 3-B)得分图有较好的组间差异性和组内聚集性, 其中空白对照组 (Control)、停止给药 12 h 组 (WD-12 h)、停止给药 24 h

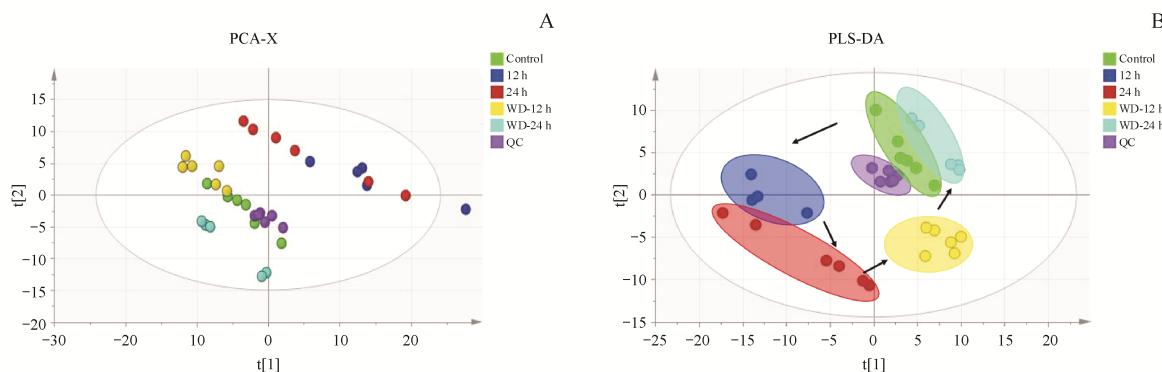


Figure 3 Principal component analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) score plots of HEI-OC1 cells treated with 20 mmol/L sodium salicylate for different time

A: PCA model for LC-Q-TOF/MS; B: PLS-DA model for LC-Q-TOF/MS

Control: blank; 12 h: Administration for 12 h; 24 h: Administration for 24 h; WD-12 h: Withdrawal for 12 h; WD-24 h: Withdrawal for 24 h

组(WD-24 h)与给药12 h组(12 h)、给药24 h组(24 h)分别聚集在左右两侧,表明其代谢图谱存在明显的差异。停止给药组与给药组明显分开,并趋近于空白对照组,说明水杨酸钠停止给药后,其对HEI-OC1细胞毒性可逆,与细胞形态结果相一致。R2是响应的实验值与模型估计值间的相关系数,Q2是响应的实验值与交叉验证估计值的相关系数,其通常用来衡量模型是否过拟合。对数据模型进行置换检验(图4),发现R2、Q2均小于右端,前者在后者之上,并且后者回归直线与纵轴截距为负值,表明模型有效可靠,未产生过拟合现象。

3.3.3 差异代谢物筛选 图5-A、5-B显示,空白组与24 h给药组以及24 h给药组和24 h停止给药组代谢物可显著地分开,表明模型具有较好的解释和预测能力。在OPLS-DA分析下得到各组

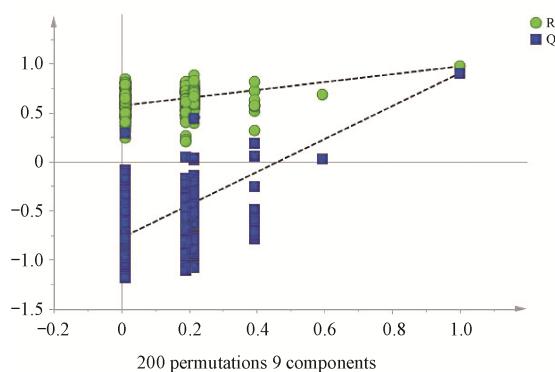


Figure 4 Permutation test in various groups of HEI-OC1 cells treated with 20 mmol/L sodium salicylate for different time

R2 represents the proportion of data variance or variation that the current model can explain, which is the interpretation rate; Q2 represents the proportion of the current model that can predict the variance of the data, which is the prediction rate

分化合物的VIP图,见图5-C、5-D。通过VIP > 1和P < 0.05的条件筛选出符合条件的差异化合物,将两组OPLS-DA所得差异代谢物取交集,并结合

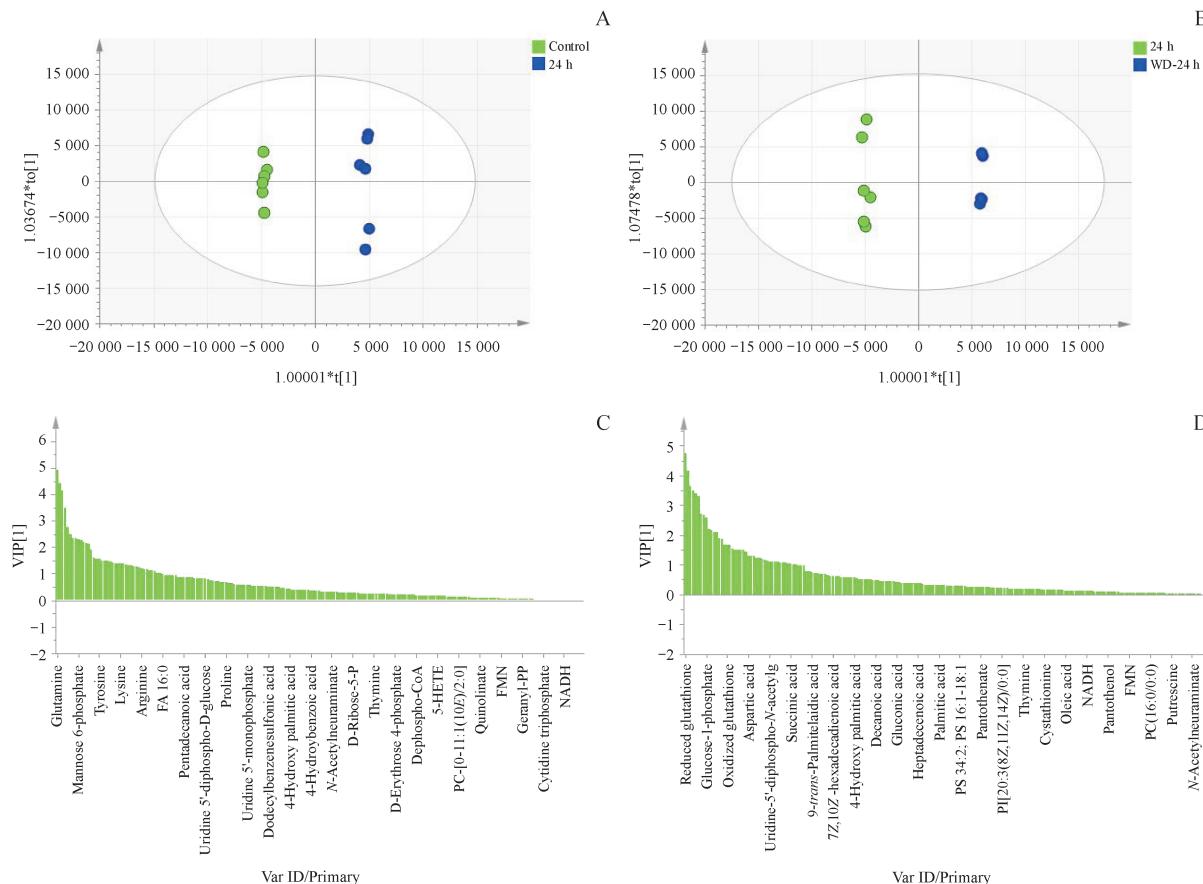


Figure 5 Orthogonal partial least squares discriminant analysis(OPLS-DA) score plots and variable importance in the protection(VIP) value plots of HEI-OC1 cells treated with 20 mmol/L sodium salicylate for different time

A: OPLS-DA of control group compared with 24 h group; B: OPLS-DA of 24 h group compared with WD-24 h group; C: VIP value plots of control group compared with 24 h group; D: VIP value plots of 24 h group compared with WD-24 h group (24 h: Administration for 24 h; WD-24 h: Withdrawal for 24 h)

HMDB、KEGG 数据库,最终筛选出差异代谢物 18 个(见表 2)。其中,脲基琥珀酸、乳清酸、色氨酸等 15 个代谢物在水杨酸钠给药后上升,停止给药后

下降;尿苷、6-磷酸葡萄糖等 3 个代谢物在给药后含量下降,停止给药后上升。

Table 2 Information of differential metabolites in HEI-OC1 cells for the ototoxicity of sodium salicylate detected by LC-Q-TOF/MS

| No. | Metabolites | <i>m/z</i> | <i>t_R</i> /min | Changed trend | |
|-----|--|------------|---------------------------|---------------|--------------|
| | | | | 24 h/Control | WD-24 h/24 h |
| 1 | Ureidosuccinic acid | 175.04 | 8.29 | ↑ | ↓ |
| 2 | Orotic acid | 155.02 | 5.59 | ↑ | ↓ |
| 3 | Tryptophan | 203.09 | 8.22 | ↑ | ↓ |
| 4 | 3'-AMP | 346.06 | 8.29 | ↑ | ↓ |
| 5 | <i>N</i> -Acetylaspartylglutamic acid | 303.09 | 8.36 | ↑ | ↓ |
| 6 | Aspartic acid | 132.04 | 8.41 | ↑ | ↓ |
| 7 | Taurine | 124.01 | 8.55 | ↑ | ↓ |
| 8 | Tyrosine | 180.07 | 8.59 | ↑ | ↓ |
| 9 | Valine | 116.08 | 8.62 | ↑ | ↓ |
| 10 | Uracil | 111.03 | 8.49 | ↑ | ↓ |
| 11 | Citric acid | 191.03 | 8.52 | ↑ | ↓ |
| 12 | Threonine | 118.06 | 8.88 | ↑ | ↓ |
| 13 | Glutamine | 145.07 | 9.01 | ↑ | ↓ |
| 14 | Cytidine | 242.09 | 8.82 | ↑ | ↓ |
| 15 | Histidine | 154.07 | 9.21 | ↑ | ↓ |
| 16 | Uridine | 243.07 | 6.91 | ↓ | ↑ |
| 17 | Uridine diphosphate- <i>N</i> -acetylglucosamine | 606.08 | 8.39 | ↓ | ↑ |
| 18 | Glucose 6-phosphate | 259.03 | 8.42 | ↓ | ↑ |

3.3.4 代谢通路分析 将筛选出的 18 个差异代谢物导入 MetaboAnalyst 网站进行代谢通路分析,以 $\text{impact} > 0.1, P < 0.01$ 为条件得出相关性较强的 2 条代谢通路包括丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸代谢以及嘧啶代谢。其中影响较显著的是嘧啶代谢,影响值更大的是丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸代谢(见图 6)。

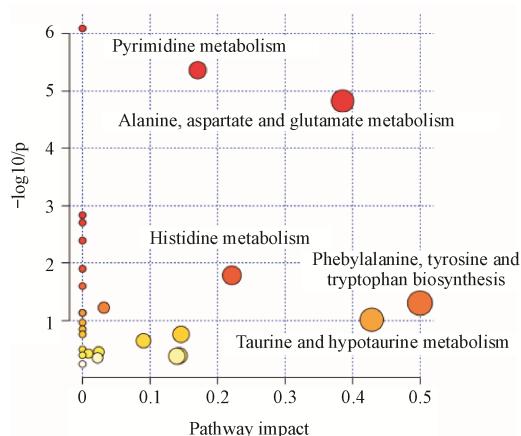


Figure 6 Pathway analysis results of HEI-OC1 toxicity caused by sodium salicylate

4 讨 论

本研究发现浓度大于 10 mmol/L 的水杨酸钠抑制了 HEI-OC1 细胞的增殖活力,改变了细胞形态,使其长度增加。水杨酸钠给药使 HEI-OC1 细胞中 18 个内源性代谢物发生显著变化,其涉及的代谢通路包括丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸代谢以及嘧啶代谢。

差异代谢物乳清酸、尿苷等参与嘧啶代谢。尿苷是核糖核酸合成所必需的嘧啶核苷酸,可以在哺乳动物体内从头合成。尿苷被广泛用于降低细胞毒性^[9]和改善神经生理功能^[10-11]。尿苷还可以通过二氢乳清酸脱氢酶(DHODH)调节线粒体呼吸链,由于线粒体功能障碍与许多疾病有关,尿苷也可用作线粒体疾病的治疗药物^[12]。给药组细胞内尿苷水平下降,从而破坏了细胞稳态,造成细胞毒性。

差异代谢物谷氨酰胺、*N*-乙酰丙酮酰谷氨酰胺(NAAG)等参与丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸代谢。

谷氨酸是耳蜗内主要的兴奋性神经递质,水杨酸钠给药后过量的谷氨酰胺可能会在耳蜗谷氨酸-谷氨酰胺循环作用生成谷氨酸,从而引起耳蜗的兴奋性毒性^[13]。NAAG是第3种最普遍及分布最广的神经递质,仅次于谷氨酸和GABA^[14]。NAAG能够激活突触前代谢受体mGluR3并降低包括谷氨酸在内的小胺类递质的共释放^[15-17]。其通常在兴奋性胺类递质升高时释放,能够反馈性地抑制其含量升高^[18]。水杨酸钠给药后HEI-OC1细胞内NAAG含量显著增加,可能是兴奋性递质上调所引起的负反馈作用。此外,水杨酸钠对HEI-OC1细胞内的其他代谢物也产生了影响。6-磷酸葡萄糖在细胞给药后含量下降,而三羧酸循环中的柠檬酸含量上升,表明水杨酸钠会对HEI-OC1细胞的能量代谢产生干扰。

综上所述,通过差异代谢物以及代谢通路生物学意义分析,推测水杨酸钠对HEI-OC1细胞的毒性作用主要是通过影响丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸代谢以及嘧啶代谢等通路而产生作用,本研究进一步阐明了水杨酸钠的耳毒性机制,为耳鸣的发生发展以及治疗提供了参考。

References

- [1] Langguth B. A review of tinnitus symptoms beyond 'ringing in the ears': a call to action[J]. *Curr Med Res Opin*, 2011, **27**(8): 1635-1643.
- [2] Bhatt JM, Lin HW, Bhattacharyya N. Prevalence, severity, exposures, and treatment patterns of tinnitus in the United States [J]. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*, 2016, **142** (10) : 959-965.
- [3] Galazyuk A, Brozoski TJ. Animal models of tinnitus: a review [J]. *Otolaryngol Clin North Am*, 2020, **53**(4):469-480.
- [4] Li SH, Han DY, Yang WY, et al. Research progress on the ototoxicity mechanism of sodium salicylate [J]. *J Audiol Speech Pathol(听力学及言语疾病杂志)*, 2001, **9**(3):174-176.
- [5] Steffens DC, Wei Jiang, Krishnan KR, et al. Metabolomic differences in heart failure patients with and without major depression [J]. *J Geriatr Psychiatry Neurol*, 2010, **23** (2) : 138-146.
- [6] Li WW, Yang Y, Wang SC, et al. Research progress of cellular metabolomics[J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med(南京中医药大学学报)*, 2017, **33**(2):187-192.
- [7] Lu Z, Li S, Sun R, et al. *Hirsutella sinensis* treatment shows protective effects on renal injury and metabolic modulation in db/db mice[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, **2019**: 4732858.
- [8] Wang W, Cai Q, Zhou F, et al. Impaired pentose phosphate pathway in the development of 3D MCF-7 cells mediated intracellular redox disturbance and multi-cellular resistance without drug induction[J]. *Redox Biol*, 2018, **15**:253-265.
- [9] McEvilly M, Popelas C, Tremmel B. Use of uridine triacetate for the management of fluorouracil overdose[J]. *Am J Health Syst Pharm*, 2011, **68**(19):1806-1809.
- [10] Gallai V, Mazzotta G, Montesi S, et al. Effects of uridine in the treatment of diabetic neuropathy: an electrophysiological study [J]. *Acta Neurol Scand*, 1992, **86**(1):3-7.
- [11] Mironova GD, Khrenov MO, Talanov EY, et al. The role of mitochondrial KATP channel in anti-inflammatory effects of uridine in endotoxemic mice [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2018, **654**: 70-76.
- [12] Le TT, Ziembka A, Urasaki Y, et al. Disruption of uridine homeostasis links liver pyrimidine metabolism to lipid accumulation [J]. *J Lipid Res*, 2013, **54**(4):1044-1057.
- [13] Sun Q. Glutamate excitotoxicity and the effect of glutamate-glutamine cycle in the cochlea (耳蜗谷氨酸兴奋性毒性及谷氨酸—谷氨酰胺循环机制的研究)[D]. Beijing: PLA Postgraduate Medical School, 2004.
- [14] Fuhrman S, Palkovits M, Cassidy M, et al. The regional distribution of N-acetylaspartyglutamate (NAAG) and peptidase activity against NAAG in the rat nervous system[J]. *J Neurochem*, 1994, **62**(1):275-281.
- [15] Zhao J, Ramadan E, Cappiello M, et al. NAAG inhibits KCl-induced [³H]-GABA release via mGluR3, cAMP, PKA and L-type calcium conductance [J]. *Eur J Neurosci*, 2001, **13**(2) : 340-346.
- [16] Sanabria ER, Wozniak KM, Slusher BS, et al. GCP II (NAALA-Dase) inhibition suppresses mossy fiber-CA3 synaptic neurotransmission by a presynaptic mechanism [J]. *J Neurophysiol*, 2004, **91**(1):182-193.
- [17] Romei C, Raiteri M, Raiteri L. Glycine release is regulated by metabotropic glutamate receptors sensitive to mGluR2/3 ligands and activated by N-acetylaspartyglutamate (NAAG) [J]. *Neuropharmacology*, 2013, **66**:311-316.
- [18] Fulop T, Radabaugh S, Smith C. Activity-dependent differential transmitter release in mouse adrenal chromaffin cells [J]. *J Neurosci*, 2005, **25**(32):7324-7332.